

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 特許公報 (B2)

(11)特許出願公告番号

特公平7-6986

(24) (44)公告日 平成7年(1995)1月30日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
G 0 1 N 33/543

識別記号 庁内整理番号  
5 2 1 9217-2J  
5 2 5 C 9217-2J

F I

技術表示箇所

(21)出願番号 特願昭59-95470

(22)出願日 昭和59年(1984)5月12日

(65)公開番号 特開昭60-1564

(43)公開日 昭和60年(1985)1月7日

(31)優先権主張番号 4 9 3 9 9 1

(32)優先日 1983年5月12日

(33)優先権主張国 米国(US)

審判番号 平3-23750

(71)出願人 99999999

チバ コーニング ダイアグノスティクス  
コーポレーション  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州  
02052 メドフィールド ノース スト  
リート 63

(72)発明者 マーク・ステイプン・ジャグノン  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州ローウ  
エル・アンドーバー・ストリート444

(74)代理人 弁理士 柳田 征史 (外1名)

審判の合議体

審判長 高松 武生

審判官 塩崎 明

審判官 志村 博

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リゲートの濃度測定方法

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 生親和性分子が共有結合し得る重合性シラン被膜によりほぼ覆われた超常磁性酸化鉄核を有する生化学用磁気応答粒子であって、該酸化鉄核は2価および3価の酸化鉄結晶群を含んでおり、光分散により測定される該粒子の平均直径は0.1~1.5μの範囲にあり、窒素ガス吸着により測定される該粒子の表面積は100~150m<sup>2</sup>/gの範囲にあり、また①磁場の存在しない状態において、その水性分散体の50%濁り度減少沈降時間が約1.5時間以上でかつ②水性分散体の容積を入れた容器を容器中の水性分散体の容積よりも小さな容積を有する永久磁石の磁極面と接触させることにより水性分散体にかけられるものである100~1000エルステッドの磁場の存在する状態において、その水性分散体の95%濁り度減少分離時間が約10分以下である水性分散体を形成するように

2

水性媒体中に分散可能である粒子質量を有しており、前記重合性シランはp-アミノフェニルトリメトキシシラン、n-ドデシルトリエトキシシランおよびn-ヘキシルトリメトキシシランからなる群より選ばれたシラン単体量から形成されたものである磁気応答粒子を用意し、溶液、既知量の標識リゲートおよび溶液中のリゲートに特異性のリガンドが共有結合されている前記磁気応答粒子を、リガンド/リゲート複合体を形成するために反応させ、

10 b) 前記磁気応答粒子を反応溶液から磁気分離し、  
c) 前記磁気応答粒子に結合した標識または溶液中の遊離標識を測定し、そして  
d) c)段階で測定された標識の量を、リゲート濃度を測定するために標準曲線に相関させる  
ことからなる溶液中のリゲートの濃度の測定方法。

【請求項2】リガンドが抗体である特許請求の範囲第1項に記載の測定方法。

【請求項3】抗体が、抗サイロキシン抗体、抗トリアイオドチロニン抗体、抗甲状腺刺激ホルモン抗体、抗甲状腺結合グロブリン抗体、抗サイログロブリン抗体、抗ジゴキシン抗体、抗コルチゾール抗体、抗インスリン抗体、抗テロフィリン抗体、抗ビタミンB<sub>12</sub>抗体、抗葉酸塩抗体、抗体フェリチン抗体、抗ヒト緜毛性ゴナドトロピン抗体、抗卵胞刺激ホルモン抗体、抗黄体化ホルモン抗体、抗プロテステロン抗体、抗テストステロン抗体、抗エストリオール抗体、抗エストラジオール抗体、抗プロラクチン抗体、抗ヒト胎盤性ラクトゲン抗体、抗ガストリン抗体および抗ヒト成長ホルモン抗体からなる群から選ばれる抗体である特許請求の範囲第2項に記載の測定方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### I. 発明の分野

本発明は、磁気応答粒子を開いた溶液中のリゲートの濃度測定方法に関するものである。特に、本発明は、数多くの種類の有機分子およびまたは生物分子が結合し得る安定なシラン被覆により囲繞された金属酸化物核による磁気応答粒子を開いた溶液中のリゲートの濃度測定方法に関するものである。（結合したまたは非結合の）粒子は、迅速な重力沈降を起こすことなく水性媒体中で分散し得また、都合のよいことに該水性媒体中から磁場を用いて再生利用され得る。ここにおいて提供される測定方法は、超常磁性すなわち磁場におかれた後においても永久磁化されない粒子を用いるものである。この特性は磁気凝集形成なしに再分散することを該粒子に許容するものである。従って、該粒子は再使用または再循環され得るものである。シラン被覆の安定度およびそれへの分子の共有結合付着もまた粒子の使用および再使用の一因子である。

本発明に用いられる磁気応答粒子は、生物分子または有機分子と親和力、吸収する能力またはある他の生物分子もしくは有機分子と相互作用する能力により結合し得るものである。このように結合した粒子は、これに限定されるわけではないが、免疫学的検定、他の生物学的検定、生化学的もしくは酵素的反応、親和クロマトグラフィー精製、細胞分類ならびに診断学的および治療学的使用を含む、分離段階または結合分子の特定位置への有向移動を伴う種々の試験管内または生体内系に使用され得る。

##### II. 発明の背景

###### II-1.

###### 生物学系における磁気分離：一般的考察

重力分離または遠心分離にかわるものとしての生物学系における磁気分離は詳しく調べられている〔ビー エル ヒルシュベイン〔B.L.Hirschbein〕ら、ケムテック〔Chemtech〕、1982年3月、172～179（1982）、エム

ポウファルザネフ〔M.Pourfarzaneh〕、ザ リガンド クオータリィ〔The Ligand Quarterly〕5(1):41～47(1982)およびピー ジェイ ホーリング〔P.J.Halling〕とピー ダンニル〔P.Dunnill〕、エンザイム ミクロバイオロジカル テクノロジー〔Enzyme.Microb.Technol〕2:2～10(1980)〕。酵素、抗体および他の生親和力吸収性物のような生物分子の支持体としての磁気分離可能な粒子の使用のいくつかの利点は、一般的に認識されている。例えば、磁性粒子は固定酵素系の固形相支持体として使用され〔例えばピージェイ ロビンソン〔P.J.Robinson〕ら、バイオテック バイオエンジン〔Biotech.Bioeng.〕、XV-603～606(1973)参照〕、酵素は、懸濁された固体を含む媒体を含み酵素反応体の再循環を許容しながら媒体より選択的に回収され得る。固体支持体として免疫学的検定または他の競合的結合検定において使用された時、遠心分離と比べて磁性粒子は均質的な反応状態（最適な結合活動を助長し、分析一吸収平衡を最小限変えるものである。）を与える、結合した分析物の非結合の分析物よりの分離を促進する。遠心分離は時間消費であり、高価でエネルギーを消費する設備を要し、放射線学的、生物学的および物理学的危険をかかえている。一方、磁気分離は、比較的迅速で、容易であり、簡単な設備を要するのみである。最後に親和クロマトグラフィー系における非極性吸着剤を結合した磁性粒子の使用は、周知の親和クロマトグラフィー系におけるよりもより良好な質量移動を与え、より失敗の少ない結果に終わる。

磁性粒子に結合することによる分子の磁気分離の一般的概念は、すでに論議されそしてこのような粒子の生物学的目的への使用的潜在する利点は認識されているが、磁気分離の実践的発達は、磁性粒子のいくつかの批判的特性によってさまたげられ、これによってほとんど発達しなかった。

大きな磁性粒子（溶液中の直径が10ミクロン以上を意味する。）は、弱磁場および弱磁場変化に対し応答し得るが、これらは、迅速に沈降する傾向があり、均質的な状態を要求する反応に対してそれらの有用性は限られている。大きな粒子はさらに小さな粒子よりも重量当たりの表面積が限られているので、これに対してはより少量の物質が結合し得るのみである。大きな粒子の例としては、50～125μの直径を有するロビンソン〔Robinson〕ら（上記の文献）のもの、60～140μの直径を有するモスバッハ〔Mosbach〕とアンダーソン〔Anderson〕〔ネーチャー〔Nature〕、270:259～261(1977)〕のものおよび50～160μの直径を有するゲスドン〔Guesdon〕ら〔ジェイ アレルギークリン イムノル〔J.Allergy Clin.Immunol.〕61(1):23～27(1978)〕のものがある。ハルシュ〔Hresh〕とヤバルバン〔Yaverbum〕により調製された複合粒子〔米国特許第3,933,997号〕は、強磁性酸化鉄(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)担体粒子を含んでいる。酸化鉄担体粒

子は直径 $1.5\sim10\mu$ を有していると報告されている。しかしながら、報告された5分間の沈降速度および複合粒子の1グラム当りわずか12gの結合容量に基づくと〔エル エス ハーシュ [L.S.Hersh] とヤベルバン、クリンチム アクタ [Clin.Clim.Acta]、63:69~72 (1975)〕、溶液中の複合粒子の実際の大きさは、実質的に $10\mu$ より大きいものと思われる。

米国特許第3,933,977号のハルシュとヤベルバンの強磁性担体粒子は、抗ジゴキシン抗体を担体粒子に化学的に結合するために、抗ジゴキシン抗体と反応し得るシランでシラン化されている。種々のシランカップリング剤が、このために参考により組み入れられる米国特許第3,652,761号に論議されている。複合粒子の直径が $10\mu$ よりもふん大きいものは、少なくともその一部は、ハルシュとヤベルバンの特許において用いられたシラン化の方法によって説明され得る。当事者間に公知のシラン化の手法はシランの重合に選ばれる媒体と反応性表面へのそれの析出においてたがいに一般的に異なるものである。トルエン〔エッチ ダブリュー ウィートール [H.W.We et al.] ; メソッズ オブ エンザイモロジイ [Methods in Enzymology]、ケイ モスバック (編集) [K.Mosbach (ed.)]、44:134~148,140 (1976) 中〕、メタノール (米国特許第3,933,977号) やクロロホルム (米国特許第3,652,761号) のような有機溶媒が用いられている。水性アルコールならびに酸含有水溶液からのシラン析出 (エッチ ダブリュー ウィートール、メソ\*

$$F = (X_V - X_V^0) VH (dH/dx)$$

(式中 $X_V$ と

$$X_V^0$$

はそれぞれ粒子と媒体の容積磁化率、 $V$ は粒子の容積、 $H$ は適用された磁場であり、また $dH/dx$ は磁場変化度である。)

この表現は、粒子形状や粒子相互作用を無視したものであるからあくまで単に概算的なものである。しかしながらこれは、磁性粒子における力が粒子の容積に直接比例していることを示しているものである。

$0.03\mu$ 以下の磁性粒子は、例えば米国特許第3,531,413号中に述べられるような、いわゆるフェロフルトイド [ferrofluid] 中に用いられる。フェロフルトイドは数多くの適用を有するが、分離をもたらすために要求される大きな磁場および大きな磁場変化度のために、磁性粒子の周辺媒体からの分離を要求する適用には非実践的である。強磁性材料は通常磁場に応答して永久磁化される。「超常磁性」と定義される材料は磁場変化度に力を受けるが、永久磁化はされない。磁性酸化鉄の結晶は結晶の大きさにより、強磁性とも超常磁性ともなり得る。鉄の超常磁性酸化物は、結晶が直径約 $300\text{\AA}$  ( $0.03\mu$ ) 以下のときもたらされ、それより大きな結晶は一般的に強磁性

\* ッズオブ エンザイモロジイ、上記、P.136 (1976) もすでに用いられている。これらのシラン化の手法のどちらも空気およびまたはオープン乾燥を脱水段階に用いる。磁気担体粒子のシラン化の用いられた時、このような脱水方法は、担体粒子のシラン化された表面が互いに接触することをもたらし、例えばシロキサン形成による粒子間の架橋、隣接粒子間のファンデルワールス相互作用もしくは物理凝着等を含む粒子間結合と潜在的に終わる。この粒子間結合は単一の担体粒子よりもかなり大きな直径のシラン化された担体粒子の共有結合したもしくは物理結合した凝集体を生じる。このような凝集体は、単位重量当り低い表面積を有し、そしてこれ故に、抗体、抗原または酵素のような分子との結合に関し低い能力を有する。このような凝集体はまた多くの適用に対して短かすぎる重力沈降時間を有している。

溶液中における平均直径が約 $0.03\mu$ 以下である小さな磁性粒子は、熱攪拌により溶液中に保たれることができ、それゆえ自然沈降しない。しかしながら、このような粒子を溶液から除去するために要求される磁場および磁場変化度は、ベンチトップワークにおける使用に不便な重く嵩のある磁石をそれらの発生に要求するように大きいものである。5000エルステッド以上の中場を発生し得る磁石は代表的に直径 $0.03\mu$ 以下の磁性粒子を分離するために要求される。粒子に作用する正味の力 ( $F$ ) と磁場との間の概算定量関係は、以下の等式により与えられる〔ヒルシュペインラ、上記文献〕。

30 を有する。磁場に最初にさらされた後に、強磁性粒子は、ロビンソンら〔上記文献〕によりおよびハルシュとヤベルバン〔上記文献〕により記されているように永久磁化された粒子間の磁力のために凝集する傾向にある。報告されるところによると直径 $300\text{\AA}$ および表面にアミン基を有するものである分散可能な磁性酸化鉄粒子は、レンバウム [Rembaum] の米国特許第4,267,234号の記載に従って、ポリエチレンiminの存在下、塩化第一鉄と塩化第二鉄の塩基性沈澱 ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 1$ ) より調製される。報告されたところでは、これらの粒子は、調製中3度磁場にさらされ、再分散可能であると述べられている。この磁性粒子は、 $0.1\mu$ の報告された直径の磁性ポリグルタルアルデヒド微小球体を形成するために、グルタルアルデヒド懸濁重合系と混合される。ポリグルタルアルデヒド微小球体は、タンパク質のようなアミノ含有分子への結合を形成し得る表面上に共役アルデヒド基を有する。しかしながら、一般的にアルデヒド基と反応し得る化合物のみが直接ポリグルタルアルデヒド微小球体の表面に結合され得る。さらに、磁性ポリグルタルアルデヒド微小球体はある適用に関して十分に安定なものではない。

## 放射標識免疫検定法における分離

放射標識免疫検定法 [radioimmunoassay] (RIA) は、抗体に結合する放射性に標識された物質を含んでいる物質の濃度の分析のため方法を述べるのに用いられる用語である。放射性結合の量は同じ抗原に結合し得る標識されていない試験物質の存在によって変えられる。標識されていない物質は、もし存在すると、結合位置に関して標識された物質と競合し、これにより抗体への放射性結合の量を減少する。結合放射能における減少は、標識曲線によって標識されていない試験物質の濃度に相関され得る。RIAの本質的段階は、結合分を定量するために達成すべきである結合標識と遊離標識との分離である。

被覆管、微粒子系および二抗体分離法を含む種々の一般的な分離策が放射標識免疫検定法 (RIA) に適用された。米国特許第3,646,346号に記載されるような被覆管は、遠心分離することなく結合標識と遊離標識との分離をなすが、2つの主たる欠点をかかえている。第1に、管の表面は反応において用いられ得る抗体の量を限定する。第2に、抗体と抗原との反応を緩慢としながら、抗体はいくつかの抗体からなるかに (0.5cmほど) 隔てられる (ジー ダブリュー パーソンズ [G.W.Parsons]、メソッズ イン エンザイモロジイ、ジェイ ランゴーン (編集) [J.Langone (ed.)] 73:225 (1981) 中およびピー エヌ ナヤク [P.N.Nayak]、ザ リガンド クオータリイ 4 (4) :34 (1981) ]。

抗体は分離を促進するため微粒子系に付着している。

〔例えば米国特許第3,652,761号および第3,555,143号参照。〕、このような系は使用される抗体のほぼ無制限に近い量を許容する広い表面積を有しているが、検定の間に該微粒子はしばしば沈降する。該管は部分的な均質化を達成するためにさえもしばしば攪拌されなければならない〔ピー エム ジャコブス [P.M.Jacobs]、ザ リガンド クオータリイ 4 (4) :23~33 (1981) 〕。結合標識と遊離標識との完全な分離をもたらすためには遠心分離がまだ要求される。

第1抗体に対して高められた第2抗体を用いる分離に伴なわって、抗体は標識された分子および標識されていない分子と反応し得る〔同一文献〕。二抗体法と定義されるこの方法は、標識との反応中における抗体の均質性を達成するが、抗原をペレット化するための遠心分離を伴なった第1抗体と第2抗体の反応のために培養期間を要する。

抗体は、ノルトリプチリン、メトトレキセート、ジゴキシン、チロキシンおよびヒト胎盤性ラクトゲンに関する放射標識免疫検定法において遠心分離段階を消去するための努力において、磁性支持体に付着された〔アール エス カメル [R.S.Kamel] ら、クリン ケム [Clin.Chem.]、25 (12) :1997~2002 (1979) ; アール エス カメルとジェイ ガードナー [J.Gardner]、クリン ケム アクタ [Clin.Chim.Acta]、89:363~370 (197

8) ; 米国特許第3,933,997号; シー ダウェス [C.Dawes] とジェイ ガードナー、クリン ケム アクタ、86:353~356 (1978); ディー エス イサキシオス [D.S.Ithakissios] ら、クリン ケム アクタ、84:69~84 (1978); ディー エス イサキシオスとディー オー クビアトウイクス [D.O.Kubiatowicz]、クリン ケム 23 (11) :2072~2079 (1977) およびエル ナイエ [L.Nye] ら、クリン ケム アクタ、69:387~396 (1976)、このため参照によって組み入れられた。〕。このような方法は大きな粒径 (直径10~100μ) に悩まされ、検定の間拡散した抗体を保つための攪拌を必要とする。実質的分離は磁場のない状態での自然沈降により起こるので、これらの従前の方法は、実際は単に磁気的に補助された重力分離である。沈降の問題は、米国特許第4,177,253号中で、空洞ガラスやポリプロピレンのような低密度核 (直径4~10μ) の粒子表面の一部を被覆 (厚さ4μ~10μ) してなる磁化粒子を用いるものである試みによりディビス [Davis] とジェンタ [Janta] により提唱されている。抗エストラジオール抗体は、このような粒子に結合し、そしてこれらのエストラジオール RIAにおける潜在的有用性が示された。この試みは沈降の問題を克服したかもしれないが、その粒径と磁性被膜はそれでもなお表面積における限定を有しそれにより抗体との結合位置の有効性において限定を有している。

## II-3.

## 他の生物学的系における磁気分離の適用

磁気分離は、RIA以外の他の生物学的系においても適用されている。蛍光免疫検定法 [fluoroimmunoassay] (FIA) や酵素免疫検定法 [enzyme-immunoassay] (EIA) のようないくつかの非同位性元素的免疫検定法は、抗体の結合した (または抗原の結合した) 磁性粒子を用いるものを発達させた。競合的結合の主要点は蛍光支持体および酵素がそれぞれ標識として放射性同位元素のかかる他はRIAにおけるものとFIAおよびEIAにおいて同一である。説明のために、エム ポーフアルザネフ [M.Poufarzaneh] らおよびアール エス カメル [R.S.Kamel] らは、抗体がプロモシアン活性化により結合する強磁性のセルロース/酸化鉄粒子を用いて、それぞれコルチゾールおよびフェニトインに関する磁化可能固形相 [magnetizable solid-phase] FIAを発展させた [エム ポーフアルザネフら、クリン ケム、26 (6) :730~733 (1980); アール エス カメルら、クリン ケム、26 (9) :1281~1284 (1980) ]。

IgEの測定に関する非競合的固形サンドイッチ技法 [non-competitive solid phase sandwich technique] EIAはジェイ エル ゲスドン [J.L.Guesdon] らにより述べられている [ジェイ アレルギー クリン イムノル [J.Allergy Clin.Immunol., 61 (1) :23~27 (1978) ]。この方法によると、グルタルアルデヒド活性化により磁性ポリアクリラミドーアガロース ビーズに

結合した抗IgE抗体は、結合をさせるためにIgEを含有試験試料で培養される。結合したIgEは、アルカリホスファターゼまたは $\beta$ -ガラクトシダーゼのいずれかで標識された第2抗IgE抗体を添加することで定量される。酵素で標識された第2抗体は、サンドイッチ状を形成しながら第1抗体と結合したIgEと複合し、そして粒子は磁気的に分離される。結合したIgEに比例したものである粒子に関連した酵素活性度は、次にIgE定量をなしながら計測される。

ビタミンBに関する磁化可能固体相非免疫放射線検定法 [magnetizable solid phase non-immune radioassay] は、ディー エス イサキシオスとディー オー クビアトウイクスにより報告されている〔クリン ケム23(11):2072~2079 (1977)〕。非免疫放射線検定法における競合的結合の主要点は、放射性同位元素標識を用いる双方の検定法でRIAにおけるものと同様である。しかしながら、RIAが抗体-抗原結合に基づくものである一方、非免疫放射線検定法はビタミンB<sub>1</sub>のようなある生物分子の特定または非特定の結合、担体もしくは受容体タンパクとの結合または相互作用に基づくものである。イサキシオスとクビアトウイクスの磁性粒子は、水不溶性タンパク基質中に包埋 [embed] されたバリウムフェライト粒子から成るものであった。

今述べた固体相生物学的検定法におけるこれらの使用の他に、磁性粒子はその他の生物学的検定法の種々のものにおいても使用されている。磁性粒子は、混合母集団より選定ウイルス、選定バクテリアおよび他の選定細胞を分離するために細胞分類系に用いられている〔米国特許第3,970,518号、第4,230,685号および第4,267,234号、このため参照により組み入れられる。〕。これらは溶液から分子を選択的に分離および精製するために親和クロマトグラフィー系に用いられており、そして特にコロイド懸濁液からの精製に有用である〔ケイ モスバッカ [K.Mosbach] とエル アンダーソン [L.Anderson] ネイチャー [Nature] 170:259~261 (1977)、このため参照により組み入れられる。〕。磁性粒子はまた、固定化酵素系における固体相支持体として使用されている。磁性粒子に結合した酵素は生化学的反応に触媒作用を及ぼすのに十分な時間基質と接触させられる。その後酵素は、生成物および非反応基質から磁気的に分離し得、そして潜在的に再使用可能である。磁性粒子は、 $\alpha$ -キモトリプシンおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼ (米国特許第4,152,210号、このため参照により組み入れられる。) ならびにグルコース イソメラーゼ (米国特許第4,343,901号、このため参照により組み入れられる。) に対する支持体として固定化酵素系において使用されている。

### III. 術語

「磁気応答粒子 [magnetically responsive particle]」ないし「磁性粒子 [magnetic particle]」なる用語は、顕著な重力沈降を起こすことなく水性媒体中に分

散可能もしくは懸濁可能でありそして懸濁液から磁場をかけることにより分離可能である粒子であり、かつ該粒子は生親和性吸着剤が共有結合し得る、吸収的もしくは共有的に結合した、有機感応性を生ずる外装ないしは被膜によって通常囲繞された磁性金属酸化物核よりなる粒子であることと定義される。

「磁性群 [magnetocluster]」なる用語は、「磁気応答粒子」および「磁性粒子」の類義語である。

「金属酸化物核 [metal oxide core]」はフェロスピネル [ferrospinel] 構造を有し、同じあるいは異なる遷移金属の三価または二価のカチオンからなる遷移金属酸化物の結晶もしくは結晶群と定義される。詳説すると、金属酸化物核は酸化鉄の超常磁性結晶群もしくは酸化鉄の強磁性結晶群より構成され得るまたは酸化鉄の強磁性単結晶によりなり得る。

「生親和性吸着剤 [bioaffinity adsorbent]」なる用語は、他の生物学的分子との特定もしくは非特定の結合もしくは相互作用し得る生物学的あるいは他の有機的分子と定義され、ここにおいて結合もしくは相互作用は、

20 「リガンド/リゲート [ligand/ligate]」結合もしくは相互作用に関連し得、また何ら限定されるものではないが、抗体/抗原、抗体/ハブテン、酵素/基質、酵素/阻止因子、酵素/補助因子、結合タンパク/基質、担体タンパク/基質、ラクチン/炭水化物、受容体/ホルモン、受容体/作用因子もしくは抑制因子/誘発因子の結合もしくは相互作用などで例示される。

「結合磁気応答粒子 [coupled magnetically responsive particle]」ないし「結合磁性粒子 [coupled magnetic particle]」なる用語は、1ないしそれ以上の種類の

30 生親和性吸着剤が共有結合によって結合される磁性粒子と定義され、ここにおいて共有結合は、磁性粒子の被膜と生親和性吸着剤の双方における結合に有効な官能性に依存するアミド、エステル、エーテル、スルホンアミド、ジスルフィド、アゾまたは他の安定な有機的の結合であり得る。

「シラン [silane]」なる用語は、二官能性のオルガノシランに関するものであり、米国特許第3,652,761号中に分子のケイ素部分が無機物に親和性を有する一方、分子中の有機部分が有機物と結合するように構成されたことを特徴とするケイ素-官能性ケイ素化合物と定義されている。シランはそのケイ素-官能性の利点により金属酸化物核の適当な被覆材料であり、そしてその有機官能性によって生親和性吸着剤に結合し得るものである。

「超常磁性 [superparamagnetism]」なる用語は、約300Å以下の結晶粒径を有する酸化鉄により表わされる磁気的挙動と定義され、ここにおいて該挙動は、永久磁化されることなく磁場に応答することにより特徴づけられる。

「強磁性 [ferromagnetism]」なる用語は、約500Å以上の結晶粒径を有する酸化鉄により表わされる磁気的學

11

動と定義され、ここにおいて該挙動は、永久磁化を伴なって磁場に応答することにより特徴づけられる。

「フェロフルイド [ferrofluid]」なる用語は、良好に分離された通常50~500Åの副変域粒径の磁性粒子の、担体液体および界面活性剤中におけるコロイド状分散体よりなる液体と定義され、ここにおいて該粒子は、最高約5000エルステッドの磁場の存在においてさえも、液体担体中に実質的に均一に分散された状態をとどめるものである。

「免疫検定法 [immunoassay]」なる用語は、多クローン性もしくは单クローン性抗体と抗原との免疫学的結合もしくは免疫学的相互作用に基づく溶液中における分析物の濃度もしくは量の計測に関する方法と定義され、ここにおいて該方法は、(a) 結合していない分析物から結合した分析物を分離することを要求し、(b) 結合した分析物およびまたは結合していない分析物の計測の手段として放射性同位元素標識、螢光測定標識、酵素標識、化学ルミネッセンス標識または他の標識を用い、そして(c) 結合した計測可能な標識の量が、元来溶液中にある分析物の量に一般的に逆比例する場合「競合的」とあるいは結合した計測可能な標識の量が、元来溶液中にある分析物の量と一般的に直接比例する場合は「非競合的」と述べられ得る。標識は、抗原中、抗体中あるいは二抗体法においては第2抗体中にあり得る。免疫検定法は、何ら限定されるわけではないが例えば放射標識免疫検定法 (RIA)、免疫放射線測定検定法 [immunoradio metric assay] (IRMA)、螢光免疫検定法 (FIA)、酵素免疫検定法 (EIA) およびサンドイッチ法免疫検定法などが例示されうる。

「結合検定法 [binding assay]」ないし「非免疫学的検定法 [non-immune assay]」なる用語は、生親和性吸着剤と他の生物学的もしくは有機的分子との抗体／抗原の結合もしくは相互作用以外の特定もしくは非特定の結合もしくは相互作用に基づく溶液中の分析物の濃度もしくは量の計測に関する方法と定義され、ここにおいて該方法は(a) 結合していない分析物から結合した分析物を分離することを要求し、(b) 結合した分析物およびまたは結合していない分析物を計測する手段として、放射性同位元素標識、螢光計測標識、酵素標識、化学ルミネッセンス標識またはその他の標識を用い、そして(c) 結合した計測可能な標識の量が、元来溶液中にある分析物の量に一般的に逆比例する場合「競合的」とあるいは結合した計測可能な標識の量が、元来溶液中にある分析物の量に一般的に直接比例する場合は、「非競合的と述べられ得る。

「固定化酵素反応 [immobilized enzyme reaction]」なる用語は、酵素的に触媒作用された生化学的な転化、合成または劣化と定義され、ここにおいて酵素分子またはその活性位置は、自由に溶融しないだけでなく、周辺媒体中に懸濁されるまたは周辺媒体に接触されかつ該媒体

12

より再生され得るまたは分離され得る固形相支持体に吸収的結合または共有結合しているものである。

「親和クロマトグラフィー [affinity chromatograph y]」なる用語は、選定分子をその周辺媒体より、周辺媒体中に懸濁されるまたは周辺媒体中に接触され、かつ該媒体より再生され得るまたは分離され得る固形相支持体に吸収的結合または共有結合している生親和性吸着剤との選定分子の結合または相互作用に基づいて、分離、隔離およびまたは精製することと定義される。

## 10 IV.発明の概要

本発明は周辺媒体からの分子の分離または周辺媒体中の分子の直接的な移動を伴なう生物学的適用に有用な新規な磁性粒子を用いた効率的な溶液中のリゲートの濃度測定方法を提供することを目的とする。

該磁性粒子は、選定された結合化学作用により広範な種類の生親和性吸着剤が共有結合し得るものである吸着結合もしくは共有結合シラン被膜により一般的に囲繞された磁性金属酸化物核よりなるものである。この磁性金属酸化物核は好ましくは超常磁性酸化鉄結晶群を含有し、

20 この被膜は好ましくは、シラン重合体であり、そしてこの結合化学作用は、何ら限定されるわけではないが、ジアゾ化カップリング、カルボシミドカップリングおよびグルタルアルデヒドカップリングを含むものである。本明細書中に述べる方法により調製される該磁性粒子は、該磁性粒子を数多くの検定方法における使用に十分許容し得る時間水性媒体中に分散された状態を保持し得るものである。該磁性粒子は粒径約0.1~1.5μのものである。注目すべきことに、この範囲の平均粒径を有する本発明に用いられる磁性粒子は、生親和性吸着剤との結合に高い能力を与えるものである約100~159m<sup>2</sup>/gほどの高い表面積を有して調製されるものである。この粒径範囲の磁性粒子は、より大きな粒子のもつ迅速な沈降の問題を克服しそしてより小さな粒子を分離するために要求された磁場および磁場変化を発生するための大きな磁石の必要性を除去するものである。本発明に用いられる磁性粒子の分離をなすに使用される磁石は、約100~約1000エルステッドの磁場を発生するものしか要求されない。このような磁場は、磁性粒子の分散を保つ容器よりも好ましく小さいものである永久磁石で得られることが

30 40 でき、これゆえ、ベンチトップ使用にも適している。本発明においては、超常磁性の挙動を有する粒子が、強磁性粒子に関連する磁気凝集を示すことがなくかつ再分散および再使用が可能であることから用いられる。

該磁性粒子の調製方法は、微細な金属酸化物結晶を形成されるためにアルカリ中に金属塩を沈殿させ、再分散させそして結晶を水中および電解液中で洗浄することでなる。磁気分離は、結晶が超常磁性である場合に洗浄液中の結晶を収集するのに用いられ得る。結晶は次にこの金属酸化物に吸着結合または共有結合し得かつ生親和性吸着剤との結合に関する有機官能性を供与し得る物質

50

で被覆される。

本発明において金属酸化物核を囲繞する被膜はシランの重合体である。シラン化は、金属酸化物結晶を酸性有機液中に再分散させ、オルガノシランを添加し、水および有機溶液のいずれにも混和し得る湿润剤の存在下に加熱により脱水し、そして得られた磁性シラン化金属酸化物を洗浄することによりなされ得る。

本発明に用いられる磁性粒子は、周知の結合化学作用により、例えばしかしながら何ら限定されることはないが、抗体、抗原および特定の結合タンパクなどのような生親和性吸着剤と共有結合することができ、そしてこの結合磁性粒子は、溶液中の分析物の計測に用いられる免疫検定法もしくは他の結合検定法に使用することができる。このような検定法は好ましくは、生親和性吸着剤に結合しておりかつ非標識分析物および標識分析物の双方に結合または相互作用し得る磁性粒子の存在下に、標識分析物の既知量と共に非標識分析物の未知量を含む試料を混合し、生ずる結合または相互作用をなさせ、磁性粒子を磁気分離し、磁性粒子に関連する標識の量およびまたは溶液中に遊離している標識の量を計測し、そして試料中の分析物の濃度を決定するために標識の量を、相似して作製された標準曲線に相関させることによりなる。本発明に用いられる磁性粒子は、既存の磁性粒子の粒径、表面積、重力沈降速度および磁気的特性に関連する問題点を克服したものである。第1.5時間を超える重力沈降時間は、本発明に用いられる磁性粒子で達成することができる、ここにおいて重力沈降時間は、磁場の存在下における50%まで低下する本発明に用いられる磁性粒子の分散体の濁り度に用する時間であると定義される。約10分間未満の磁気分離時間は、磁性粒子の分散体を含んでいる容器をこの容器より容積的に大きくない永久磁石の磁極面と接触させることによって本発明に用いられる磁性粒子で達成することができる、ここにおいて磁気分離時間は、95%まで低下する分散体の濁り度に要する時間であると定義される。さらに、本明細書中に述べられた磁性粒子の金属酸化物核を囲繞する被膜としてのシランの使用は、より限定された結合官能性をもつ公知の磁性粒子被膜と比べて同様に広範囲の結合条件下における広範な種類の分子との結合を可能とする。

本発明に用いられる磁気応答粒子は、超常磁性の特性を維持しながら低磁場(100~1000エルステット)において該粒子の十分な分離を生じるものである超常磁性結晶群よりなる金属酸化物核を有するものである。粒子の凝集は、意図された生物学的検定法またはその他の適用において使用されるために該磁性粒子の分散を十分許容し得る時間実質的な重力沈降がなきようには好ましくは十分小さなものである粒子を生成するように、粒子合成の間制御される。磁性応答粒子中に超常磁性核を有することの利点は、このような粒子がくり返し磁場にさらされ得るということである。このような粒子は、永久磁化され

ず、それゆえ磁気凝集を起こさないために、このような粒子は再分散および再使用できる。シラン化の後においてさえも、結晶群によりつくられた核を有する本発明の好ましい粒子は、このような粒子が開放または多孔質構造を有することを示すものである単位重量当りの非常に高い表面積および一般的に相応する高い結合能力を示すものである。

第II節で述べた生物学的系において使用された既存の磁性粒子のいずれも、本発明に用いられる磁性粒子と同様な、粒径、表面積、結合融通性、沈降特性および磁性的挙動を有していない。本発明の磁性粒子は、文献において報告される多くの検定法、酵素固定化法、細胞選別法および親和クロマトグラフィー法に適しており、そして実際このような手法において過去に経験された粒子沈降および再使用に関する問題を克服しているものである。

#### V. 本発明の具体的説明

##### V-1.

###### 磁性粒子調製

本発明に用いられる磁性粒子は、2つの段階により調製され得る。第一に、超常磁性酸化鉄が、例えば $\text{FeCl}_2$ および $\text{FeCl}_3$ のような二価( $\text{Fe}^{2+}$ )および三価( $\text{Fe}^{3+}$ )の鉄塩のアルカリ中の沈殿により調製される。第二にオルガノシラン被膜が、この酸化鉄に適用される。

$\text{Fe}^{2+}$ と $\text{Fe}^{3+}$ との比は、最終製品中における実質的変更をせずに、鉄の一定モル量を維持しながら $\text{Fe}^{2+}$ の量を増加することで変えられ得る。好ましい $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ は2/1であるが4/1の $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比もまた、第VI-1節の製法において適当に作用する(第VI-7節をさらに参照のこと。)。1/2の $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比は、それにより高い $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比より得られものよりわずかに品質の劣った磁性粒子を生ずる。この磁性酸化物は「ブリード」を起す傾向すなわち第VI-1節の洗浄方法において可溶となる傾向にあり、そして粒径は2/1ないし4/1の $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比から得られたものより不均一である。それにもかかわらず、これは、第VI-7節で例示されるような有用な磁性粒子を生じるようにシラン化され得るものである。

酸化鉄の水性溶液は、超常磁性酸化鉄の結晶性沈殿物を形成することをもたらす例えば水酸化ナトリウムのようなアルカリ中に混合される。この沈殿物は、磁気分離を用いて水でくり返し洗浄され、そして中性pH値に達するまで再分散される。この沈殿物は次に一度例えば塩化ナトリウム溶液のような電解液中で洗浄される。電解液洗浄段階は、酸化鉄結晶の純度を保障するために重要である。最後に沈殿物は、メタノールで1.0% (v/v) 水の残留物を残すところまで洗浄される。

洗浄段階における懸濁液から酸化鉄を分離するための磁場のくり返しの使用は、超常磁性により容易である。いかに多くの回転該粒子が磁場におかれただとしても、これらは決して永久磁化することなく、従ってゆるやかな攪拌をすれば再分散される。永久磁化される(強磁性)金

15

腐酸化物は、磁場にさらした後に磁気凝聚する傾向がありそして均一に再分散できないので、このような洗浄手段によっては調製され得ない。

マグネシウム塩、マンガン塩、コバルト塩、ニッケル塩、亜鉛塩および銅塩のような他の2価の遷移金属塩は、磁性金属酸化物を得るのにこの沈殿手法において鉄(II)塩に変えることができる。例えば第VI-1節の手法における $\text{FeCl}_2$ の2価のコバルト塩化物( $\text{CoCl}_2$ )での置き換えは、強磁性金属酸化物粒子を生成した。 $\text{CoCl}_2$ でこのように調製される強磁性金属酸化物粒子は、該粒子を磁化しないため、洗浄と洗浄の間に遠心分離または濾過などの周知手段を用いて磁場の不存在下に洗浄され得る。得られた強磁性金属酸化物が水性媒体中で分散体をとどめるのに十分小さな粒径である限り、これらはまたシラン化され得、そして例えばある放射標識免疫検定法のような1回の磁気分離を要求する系における使用のために生親和性吸着剤に結合され得る。強磁性は、再分散または再使用を要求する適用における粒子の有用性を限定する。

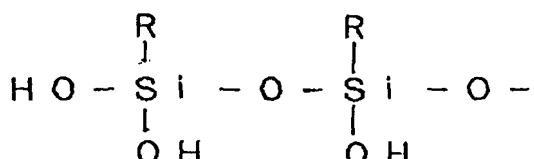
アルカリ沈殿により調製された磁性金属酸化物は種々の適當なシラン類のいずれか1つにより被覆され得る。シランカップリング材料は、2つの特徴を有しており、そ\*



\* われはこれらが金属酸化物に吸着結合または共有結合し得ることと、これら有機官能性により生親和性吸着剤と共有結合を形成し得ることである。

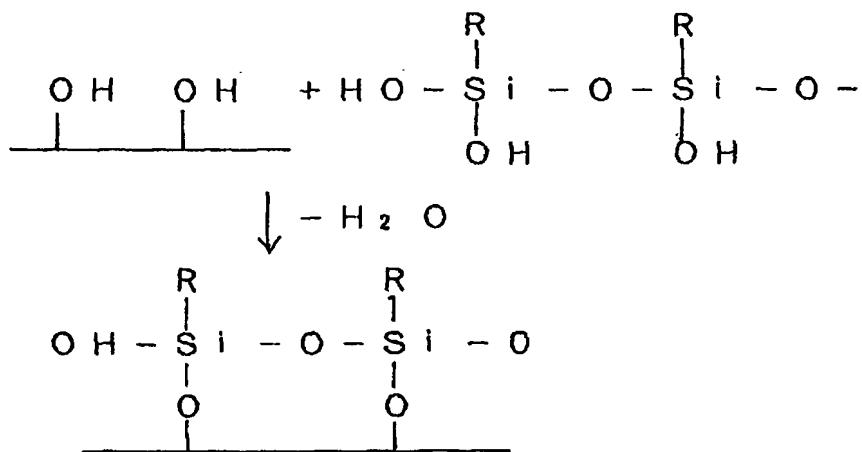
本発明に用いられる磁性粒子の金属酸化物核を被覆するのにシラン化が用いられる場合、一般式R-Si(OX)<sub>3</sub>〔ただし式中、(OX)<sub>3</sub>は代表的にはトリメトキシもしくはトリエトキシのようなトリアルコシ基であり、またRは末端にアミノフェル、アミノ、ヒドロキシリ、スルフィドリル、脂肪性、親水性もしくは混成官能性（両親媒性）を有するアリル、アルキルもしくはアラルキル基または生親和性吸着剤に共有結合するのに適した他の有機基である。〕を有するオルガノシランが用いられ得る。このようなオルガノイランは、P-アミノフェニルトリメトキシシラン、n-ドデシルトリエトキシシランおよびn-ヘキシルトリメトキシシランからなる群より選ばれる。

本発明の一実施例態様において、シランは酸性有機溶媒中から金属酸化物核上に析出される。このシラン化反応は2段階的に起こる。第一に、トリメトキシシランは、  
20 メタノールのような有機溶媒、水および例えばリン酸もしくは氷酢酸からなるものの中に入れられる。これはシラン重合体を形成するように縮合される。



第二に、これらの重合体は、金属酸化物と結合する、おもに30%することによるものと思われる。

そらくこれは、表面OH基との脱水による共有結合を形成※



金属酸化物へのシラン重合体の吸着もまた可能である。本発明に係る酸性有機シラン化方法の重要な点は、シラン重合体の金属酸化物への吸着結合または共有結合をもたらすために用いられた脱水方法である。この結合は、

有機溶媒と水のどちらにも混和し得る湿润剤の存在下にシラン重合体と金属酸化物とを加熱することで達成される。約290°Cの沸点を有するグリセロールが適当な湿润剤である。グリセロールの存在下に約160~170°Cに加熱

することは、2つの目的を与える。これは水、有機溶媒（これは例えば、メタノール、エタノール、ジオキサン、アセトンまたはその他の適当な極性溶媒である）および過剰なシラン単量体の蒸発を保証する。さらに、グリセロールの存在は、脱水が乾燥のために加熱により行なわれる公知の他のシラン化方法の生來の問題である粒子の凝集ないしは塊状化および粒子の潜在的架橋を防ぐものである。

本発明の他の実施態様において、酸性水性シラン化方法が、シラン重合体を金属酸化物核上に析出するために用いられる。ここにおいて金属酸化物は、10%シラン単量体の酸性（pH約4.5）水溶液中に懸濁される。シラン化は、約2時間90°～95°Cで加熱することにより達成される。

グリセロール脱水がまた使用される。

酸化鉄粒子上のシランの存在は、以下の観察により確証された。第一に、6N-塩酸での処理の後、該酸化鉄は溶解し、シラン化されていない酸化鉄が同様に消化されても存在しない白色の無定形の残留物が残った。この酸不溶性残留物がシランであった。第二に、第VI-4節のジアゾ化法は、該粒子への抗体の付着を許容した。ジアゾ化はシラン化されていない粒子の付着は促進しない。最後に、抗体の付着は極めて安定であり、金属酸化物への抗体の吸着によるものよりもかなりすぐれて安定している。

#### V-2.

#### シランカップリング化学作用

シラン被膜の選択および磁性粒子への生親和性吸着剤の結合に対する特定の化学作用に関する最初の考察は、生親和性吸着剤それ自体の状態、たとえば温度やpHなどのような因子に対する感受性ならびに結合に関する分子上の反応基の有用性である。

例えば、抗体が磁性粒子に結合すべきである場合には、結合化学作用は免疫グロブリンタンパクに非破壊的であるべきであり、共有結合は、抗体／抗原相互作用が遮断ないし妨害されないようにタンパク分子上の部位に形成されるべきであり、そして得られる結合は選択された結合条件下で安定であるべきである。同様に、酵素が磁性粒子に結合すべきである場合には、結合化学作用は酵素タンパクを変性すべきではなく、そして、共有結合は活性もしくは触媒作用性部位並びに酵素／基質もしくは酵素／補助因子相互作用により干渉され得るその他の部位以外の分子上の部位で形成されるべきである。

種々のカップリング化学作用が当業者に公知であり、また、上述した参考により組み入れられた米国特許第3,652,761号において述べられている。詳述すると、ジアゾ化は、p-アミノフェニル末端化シランを免疫グロブリンに結合することに用いられる。免疫グロブリンおよび他のタンパクの3-アミノプロビル末端化シランおよびN-2-アミノエチル-3-アミノフェニル末端化シ

ランへの結合はグルタルアルデヒドの使用により達成されている。この手法は2つの基本的段階すなわち、1)未反応のグルタルアルデヒドの除去を行なうものであるグルタルアルデヒドとの反応による粒子の活性化と、2)未反応のタンパクの除去を行なうものであるタンパクの活性化粒子との反応をよりなるものである。この手法はタンパクおよび細胞の固定化に広範に使用される〔エイ エム クリバノフ [A.M.Klibanov]、サイエンス [Science]、219:722 (1983)、このため参照により組み入れられた。〕磁性粒子がカルボキシ末端化シランによって被覆された場合には、タンパクおよび免疫グロブリンのような生親和性吸着剤は、最初に該粒子を3-(3-ジメチルアミノプロビル)カルボジイミドで処理することによってこれらの結合され得る。

一般的にある有機官能性を供与するシランで被覆された磁性粒子は、表面上にすでに存在する官能性をより望ましい官能性に置き換えるように変更され得る。例えば、ジアゾ誘導体は、p-ニトロ-安息香酸との反応、ニトロ基のアミンへの還元、そして次に亜硝酸でのジアゾ化により3-アミノプロビルトリエトキシシランから調製され得る。同じシランが、アミノ官能基のチオホスゲンとの反応によりイソチオシアノアルキルシラン誘導体へ転化され得る。

磁性粒子への結合をもたらすために、生親和性吸着剤の水性溶液がシラン被膜粒子と室温もしくはそれ以下の温度で接触され得る。タンパク（ないしは免疫グロブリン）が結合されるべき場合、一般的に1:10～1:30のタンパク (mg) : 粒子 (mg) の比が用いられる。約3～24時間の接触時間が通常、結合に十分である。この時間の間pHは、生親和性吸着剤を変性させない値に維持されそしてその最良の値は、例えばアゾ結合の場合pH8～9であるよう、形成される結合の種類に合わせたものである。

さらに詳細に第VI-5節、第VI-8節および第VI-10節でそれぞれ述べられるジアゾ化法、カルボジイミド法またはグルタルアルデヒド法のいずれかによる抗体のシラン被覆磁性粒子へ結合の後に、抗体は以下の苛酷な処理を行なった後でさえも磁気性をとどめた：リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中に50°Cで24時間、PBS中に37°Cで21日間、1M-塩化ナトリウム中に23°Cで30分間および室温でエタノールまたはメタノール中での反復的洗浄。酸に鉄に吸着された抗体は、実質的にこれらのいかなる処理によっても解離されない。これらの結果は、シランが非常に堅固に金属酸化物と結合していることおよび抗体の該粒子への結合は本質的に不可逆的共有結合よりなされたものであるということを示すものである。シランの金属酸化物への生親和性吸着剤（例えば抗体）の共有結合を伴なった堅固な結合は、商品的に重要な特質である、結合磁性粒子上へ安定性を与える特徴点である。

生物学的検定法における磁性粒子の使用診断学的または研究的目的に使用される検定法の最も普及した種類は、競合的結合の主体に基づいた放射標識免疫検定法、蛍光免疫検定法、酵素免疫検定法および非免疫放射線検定法である。基本的に、抗原のようなリゲート [ligate] に指向した例えは抗体もしくは特異性結合タンパクのようなリガンド [ligant] は、過剰な標識リゲート (\*リゲート) で飽和される〔あるいは、競合的検定法は標識リガンドと非標識リゲートとで行なわれ得る。サンドイッチ検定法と呼ばれる非競合的検定法もまた広範に用いられ得る。〕本発明の方法によると、リガンドは磁性粒子に結合される。標識の例としては、トリリウム、<sup>14</sup>C、<sup>17</sup>Coおよび好ましくは<sup>131</sup>Iのような放射性同位元素、ローダミンイソチオシアネートおよびフルオレセインイソチオシアネートのような蛍光測定標識、またアルカリホスファターゼおよびβ-D-ガラクトシダーゼのような酵素（一般的に酵素反応が計測され得る容易さで選ばれる。などがある。非標識リゲートがリガンドに\*リゲートを伴なって加えられると、非標識リゲートの標識リゲート (\*リゲート) に対する比が増加するので、より少ない\*リゲートがリガンド-リゲート複合体中に見い出されるであろう。リガンド-リゲート複合体が\*リゲートから物理的に分離され得ると、試験物質中の非標識リゲートの量が決定され得る。

非標識リゲートを計測するために、標準曲線が作成されなければならない。これはリガンドと\*リゲートのある固定した量を混合し、そしてそれそれに非標識リゲート

の既知量を加えることにより行なわれる。反応が完了した際、リガンド-リゲート複合体は\*リゲートから分離される。そして収集されたりガンド-リゲート複合体中の標識を添加した非標識リゲートに関係させたグラフが作成される。実験試料中の非標識リゲートの量を決定するために、試料の標本（アリクウォット [aliquot]）が標準曲線を得るのに用いられたのと同じリガント-リゲート混合物中に添加される。リガント-リゲート複合体は収集され、標識が測定され、そして非標識リガントの量が標準曲線から読み取られる。これは、たとえどのような複合体でもリガント-リゲート相互作用を何も妨害しない限り、いずれの試料でも可能である。本発明の方法により、リガント-リゲート複合体は遊離\*リゲートから磁気的に分離される。

この一般的方法論は、ホルモン、医薬剤、ビタミンおよび補助因子、血液学的物質、ウィルス抗原、核酸、ヌクレオチド、グリコシドならびに糖を含む広範な種類の化合物の計測に関する検定法において適用され得るものである。詳細のために、第1表にあげた化合物はすべて磁性粒子免疫検定法および磁性粒子結合検定法により測定可能である〔ディー フレイフィルダー [D.Freifelder]、フィジカル バイオケミストリー [Physical Biochemistry], p259、ダブリュー エッチ フリーマン アンド コンパニー [W.H.Freeman and Company]、サンフランシスコ (1976) を参照のこと。〕。

第 1 表磁気粒子検定法で測定可能な物質ホルモン類

甲状腺ホルモン類 (サイロキシン、 トリアイオドチロニン、 甲状腺結合グロブリン、 甲状腺刺激ホルモン、 サイログロブリン)	プロラクチン サイロカルシトニン 上皮小体ホルモン ヒト绒毛性ゴナドトロ ビン ヒト胎盤性ラクトゲン 下垂体後葉製ペプチド 類(オキシトシン、 バソプレシン、ニュ ロフィジン) プラジキニン コルチゾール コルチコトロビン ヒト成長ホルモン 黄体化ホルモン テストステロン
胃腸ホルモン類 (グルカゴン、ガスト リン、エンテログルカ ゴン、セクレチン、パ ンクリオザイミン、 血管作動性腸ペプチド、 胃抑制ペプチド、モチ リン、インスリン)	
卵胞刺激ホルモン プロゲステロン	

## (第1表統き)

エトストリオール	エストラジオール
<u>医 藥 剤</u>	
ジゴキシン	テトラヒドロカンナビ
テロフィリン	ノール
モルヒネおよびアヘン のアルカロイド類	バルビツレート類
心臓グリコシド類	ニコチンおよび代謝
プロスタグラランジン類	生産物類
リゼルギン酸および その誘導体類	フェノチアジン類
<u>ビタミン類および補助因子類</u>	アンフェタミン類
ビタミンD	ビタミンB <sub>12</sub>
<u>葉 酸</u>	サイクリックAMP
<u>血液学的物質</u>	
フィブリノーゲン、 フィブリンおよび フィブリノペプチド	プロトロンビン トランスフェリン およびフェリチン
プラスミノゲンおよび プラスミン	エリスロポイエチン 抗血液向性因子

## (第1表続き)

ウイルス抗原

肝炎抗原	ポリオウイルス
単純ヘルペス	狂犬病ウイルス
ワクシニア	Q熱ウイルス
種々のA群アルボ	オウム病ウイルス
ウイルス類	

核酸類およびヌクレオチド類

DNA	RNA
シトシン誘導体類	

## VI. 実施例

## VI-1.

## 金属酸化物の調製

金属酸化物粒子は以下のとく鉄(II) ( $Fe^{2+}$ ) の塩と鉄(III) ( $Fe^{3+}$ ) の塩の溶液をアルカリと混合することにより調製される。すなわち、0.5M塩化第一鉄 ( $FeCl_3$ ) と0.25M塩化第二鉄 ( $FeCl_2$ ) の溶液 (200ml) が5M水酸化ナトリウム ( $NaOH$ ) (200ml) と60°Cで、100mlの蒸溜水を入れた500mlビーカーに双方の溶液を注ぐことにより混合された。特に注釈しない限りすべての段階は室温にて行なわれた。この混合物は、約2分間攪拌され、この時間の間に黒色の磁気沈殿が形成された。沈降した後において、沈降沈殿物の容積は約175mlであった。この沈殿物中の鉄酸化物の濃度は約60mg/mlであった。

(下記に測定した鉄11.2mgの収率に基づく。)。これは、例えばレコーディングテープ用の標準的磁性酸化物であるピフィザー # 2228  $\gamma Fe_2O_3$  [Pfizer # 2228  $\gamma Fe_2O_3$ ] [ピフィザー ミネラルズ [Pfizer Minerals]、ピグメンツ アンド メタルズ ディビジョン [Pigments and Metals Division]、ニューヨーク州、ニューヨーク州]のような、水性スラリー中に約700mg/mlの濃度で得られる市販の磁性酸化鉄とは著しく異なるものである。この比較は、本方法により調製された粒子の微細性を強調することも含んでいる。非常に微細な粒子はち密な充填ができないおよび最も多くの水を吸い入れる。一方、より大きくそしてよりち密な粒子は、ち密に充填され水を除去する。

沈殿物は次に、pHペーパーで測定してpH6~8に達するまで水で洗浄された。以下の洗浄方法が用いられた。すなわち、該粒子は21ビーカーに入れた1.8lの水の中に懸濁されそして磁気的抽出により収集された。このビーカ

20 一は高さ1/2インチ(約1.27cm) 直径6インチ(約15.24cm) の環状磁石の上端におかれ、そして磁性粒子がこれにより沈降した。水は、水を移す間磁石をビーカーの底部に保持することで、該粒子の損失なく取り除かれた。同様の洗浄方法が、容積が必要により調整されることを除いて、すべての洗浄を通して用いられた。代表的に、中性pHに達するのに3回の洗浄で充分であった。該磁性粒子は次に一度、同じビーカー中で0.02M塩化ナトリウム ( $NaCl$ ) 1.0lで洗浄された。

水は次に、メトキシランの加水分解に触媒作用を及ぼすための水の痕跡を残しながら、メタノールで置き換えられた(第VI-2節参照)。これは、0.2M  $NaCl$  1800mlで吸出し、総容量1lをエタノールで運ぶことによりなされる。この物質は再懸濁され、そして、磁気的抽出され、懸濁液800mlが除去されそして他の800mlのメタノールが加えられた。メタノールの3回添加の後、該酸化物は約1% (v/v) 水である溶液中においてシラン化の用意をした。沈殿物の一部が70°Cで24時間乾燥され計量された結果、11.2gの酸化鉄が形成されていた。

この方法を通して、磁性酸化鉄粒子は、その超常磁性の特性ゆえ、磁場にさらすことをくり返しても永久磁化沈殿となることは決してないということに注目すべきである。従って、水洗浄およびメタノールでの置換処理の間粒子を再懸濁させるためには単にゆるやかな攪拌が要求されるにすぎなかった。

## VI-2

## シラン化

約1% (v/v) の水を含むメタノール250ml中に懸濁された磁性酸化鉄粒子(第VI-1節参照)はヴィルテス 23 ホモゲナイザー [Virtis 23 homogenizer] [ヴィルテス コンパニー インコーポレーテッド [Virtis C

50

ompany, Inc.]、ガーディナー、ニューヨーク州]中へ入れられた。オルトアリシン酸〔フィッシャー サイエンティック コーポレーション [Fisher Scientific Co.]、ピッツバーグ、ペンシルバニア州] 2gとP-アミノフェニルトリメトキシラン〔A-7025、ペトラーチシステムス インコーポレーテッド [Petrarch System, Inc.]、プリストール、ペンシルバニア州〕10mgが加えられた。別の態様において、冰酢酸5mlがオルトアリシン酸2gと置き換えられた。混合物は、23,000rpmで10分間および9,000rpmで120分間均質化された。内容物はグリセロール200mlを入れたガラス製の500mlビーカー中に注ぎ移され、そして160°～170°Cの温度に達するまでホットプレート上で加熱された。混合物は室温へ冷却させられた。加熱および冷却の両段階とも窒素条件下で攪拌しながら行なわれた。グリセロール粒子スラリー(容積約200ml)が2lビーカーに入れられた水1.5l中に注ぎ入れられ、該粒子は第VI-1節で述べた方法に従い水で徹底的に(通常4回)洗浄された。

このシラン化方法は、3-アミノプロビルトリメトキシラン、N-2-アミノエチル-3-アミノプロビルトリメトキシラン、N-ドデシルトリエトキシランおよびN-ヘキシルトリメトキシラン〔それぞれA-0800,A-0700,D-6224およびH-7334、ペトラーチシステムス インコーポレーテッド、プリストール、ペンシルバニア州〕を含むその他のシランを用いても行なわれた。

上記のシラン化方法に代わる方法として、シランはまた酸性水溶液から超常磁性酸化鉄(第VI-1節において調製された。)上に析出された。

$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比が2である超常磁性酸化鉄が第VI-1節に述べたようにして水で洗浄された。メタノールへの移行は省かれた。粒子1g(沈降粒子約20ml)が3-アミノプロビルトリメトキシラン10%水溶液100mlと混合された。pHは、冰酢酸で4.5に調節された。混合物は、電気モーターに取付けられた金属攪拌板で混合しながら90～95°Cで2時間加熱された。冷却の後、粒子は水(100ml)で3回、メタノール(100ml)で3回、そしてさらに水(100ml)で3回洗浄された。粒子上のシランの存在が確認された。

### VI-3.

#### シラン化磁性粒子の物理的特性

p-アミノフェニルシラン化粒子、3-アミノプロビルシラン化粒子およびN-2-アミノエチル-3-アミノプロビルシラン化粒子に関する光散乱により測定された平均粒径および窒素ガス吸着により測定された1グラム当りの表面積が第4表に示される。粒子表面積は、タンパクを結合する粒子の能力に密接に関係するものであり、300mg/gほどの多量のタンパクがN-2-アミノエチル-3-アミノプロビルシラン化粒子に結合され得、これは従前に報告された粒子の12mg(タンパク)/gの値

よりも極めて高い値である〔ハルシュとヤベルバン、クリン ケム アクタ63:69 (1975)〕。比較のために、シラン化磁気鉄の2つの仮定球状粒子に関する1グラム当りの表面積が第2表中にあげられている。該仮定粒子の密度は、シラン化磁気鉄粒子の密度の概算である2.5g/ccであると解釈された。それぞれの仮定粒子の粒径は、仮定粒子に関する事項が記載された瞬の本発明に用いられる粒子の平均粒径であると解釈された。窒素ガス吸着によって測定された本発明に用いられる粒子の1グラム当りの表面積が同じ粒径のシラン化磁気鉄の完全な球体に関する計算された1グラム当りの表面積よりもはるかに大きいことが観察できる。本発明に用いられる粒子のこのより大きな1グラム当りの表面積は、本発明に用いられる粒子が多孔性構造あるいはさもなくば開放構造を有していることを示すものである。粒径0.01μを有するシラン化磁気鉄の仮定真球体は約120m<sup>2</sup>/gの計算された1グラム当りの表面積を有している。

第 2 表

#### シラン化磁気粒子の特性

シラン	平均粒径 <sup>1</sup> (μ)	測定表面 積 <sup>2</sup> (m <sup>2</sup> /g)	仮定表面 積 <sup>3</sup> (m <sup>2</sup> /g)
N-2-アミノエチル-3-アミノプロビルシラン	0.561	140	4.3
P-アミノフェニルシラン	0.803	測定せず	-
3-アミノプロビルシラン	0.612	122	3.9

1. 粒径(ミクロン)はコウルターN-4パーティクルサイズアナライザー[Coulter N-4 Particle Size Analyzer]における光分散により測定された。
2. 表面積はN<sub>2</sub>ガス吸着により測定された。
3. 2.5g/∞の濃度を有する真球体に関する計算された1グラム当りの表面積。

第VI-1節および第VI-7節の方法により調製されたシラン化磁性粒子の平均粒径は、文献中に述べられた他の磁化粒子の粒径よりもかなり小さいので、従前に報告されたこれらの他の磁性粒子の重力沈降時間よりも、該シラン化磁性粒子はより遅延された重力沈降時間を示す。

例えば、ここに述べられる該粒子の沈降時間は約150分であり、これはa) 10μより大きい粒径と概算されたハルシュとヤベルバンの粒子に関する約5分〔クリン ケム アクタ 63:69 (1975)〕および粒径50～160μであるロビンソンらの粒子に関する約1分〔バイオテック バイオエンジ XV:603 (1973)〕とははなはだ異なるものである。

本発明に用いられるシラン化磁性粒子は、これらが弱い磁場に対して迅速に応答するものであるにもかかわらず、それらの粒径および組成の結果としての重力沈降の非常に遅い速度を有することにより特徴づけられる。こ

れは、磁場の不在化に自然的粒子沈降によりもたらされるシラン化磁化粒子の懸濁の時間を通しての濁り度における変化がサマリウム-コバルト磁石の存在下における濁り度と比較される第1図に描かれる。30分経過後において、懸濁液の濁り度は、磁場の不在下においてわずかに10%より大きいものとしか変化しなかったことが観察され得る。しかしながら、弱い磁場の存在下においては、粒子懸濁液の濁り度は、6分以内にその最初の値の95%以上近くも下降した。他の実験において、30分間でわずか約4%の濁り度の減少が観察された。

3-アミノトリメトキシランでシラン化された超常磁性粒子（「SIN」粒子）の顕微鏡写真図が第2図において示されている。粒子は形状および粒径において異なっていること、そしてこれらは、形状において粗い球状を現わすものである個々の超常磁性結晶（300Å以下）の群から形成されていることを観察することができる。

## VI-4

サイロキシンに対する抗体へのアミノフェニルシラン化磁性粒子の結合

第一に、サイロキシン（T<sub>4</sub>）抗血清が以下のように調製された。

T<sub>4</sub>で免疫されたヒツジの血清〔ラジオアッセイ システムズ ラボラトリーズ インコーポレーテッド [Radioassay Systems Laboratories, Inc.]、カーソン、カリフォルニア州〕5.0mlが50ml遠心分離機チューブへ入れられた。リン酸緩衝食塩水の5.0mlアリクオットの2つが80%飽和硫化アンモニウム15mlを伴って、pH7.4, 4°Cで該チューブに加えられた。混合の後に、該チューブは4°Cで90分間保存された。混合物は次に、4°C, 3000rpmで30分間遠心分離された。上澄み成分は取り移され、そしてペレットはPBS5.0ml中に再懸濁され清澄となるまで溶解された。このT<sub>4</sub>抗血清調製品（PBS中1:2）は、PBSで透析され、PBS40mlが入れられた50ml遠心分離機チューブへ透析管から移されて総容積50mlとされた。このT<sub>4</sub>抗血清調製物（PBS中1:10）は、結合に用いられるまで冷蔵された。

1N-塩酸（HCl）100ml中のp-アミノフェニルシラン化粒子1740mgへ、0.6M-亜硝酸ナトリウム（NaNO<sub>2</sub>）25mlが加えられた。このNaNO<sub>2</sub>は、凍結しないように注意して0°C～5°Cの温度を維持しながら、粒子/HCl混合物の表面下にゆっくりと加えられた。10分経過した後、混合物は、0°～5°Cの温度で保ったまま、1.2M-NaOH65mlおよび1M-炭酸水素ナトリウム（NaHCO<sub>3</sub>）18mlを加えることによりpH7.5～8.5とされた。次にサイロキシンに対する抗体を含むヒツジの血清のヤーグロプリン成分100mgを含むPBS50ml（上記に述べたT<sub>4</sub>抗血清調製物）が加えられた。pHは、混合物が0°C～5°Cで18時間培養される間、7.5～8.5の間に保たれた。得られた抗体結合粒子は、pH7.2の0.1M-リン酸ナトリウム緩衝剤で3回、1M-NaClで、メタノールで、1M-NaClで、そしてさらに0.

1M-リン酸ナトリウム緩衝剤で洗浄し、完全に洗浄された。この洗浄段階は2度ないしそれ以上くり返された。すべての洗浄は、第VI-1節で述べたように粒子を分散させそしてこれを磁気分離することによりなされた。洗浄の後、粒子はPBS中に再懸濁されそして一晩50°Cで培養された。この粒子は前に述べたようにしてメタノール、1M-NaClおよび0.1M-リン酸ナトリウム緩衝剤中で洗浄し、そして2度フリーT<sub>4</sub>、トレーサー バッファ [Free T<sub>4</sub>, Tracer Buffer] 中で洗浄し、放射標識免疫検定法に用いるまで4°Cにて保存された。

## VI-5.

サイロキシンに対する磁性粒子放射標識免疫検定法  
サイロキシンの放射標識免疫検定法（RIA）に用いられる抗体結合磁性粒子の量は、以下のRIA法を用いて経験的に決定された。

標準の2マイクロリットル（μl）が、トレーサー（追跡子）500μlおよび磁性粒子100μlを伴なって12×75mmポリプロピレン製チューブ中へビペットを用いて入れられた。渦動の後、混合物は37°Cで15分間培養され、その後該チューブは10分間マグネットラック上に置かれた。このマグネットラックは、それぞれのチューブの底部がくる位置に円筒状の「バトン [button]」磁石〔インカ-18 [Inca-18]、インディアナ ジェネラル マグネット プロダクツ コーポレーション [Indiana General Magnetic Products Corp.] パルバライソ、インディアナ州〕を有する試験管ホルダーから成るものであった。抗体および結合トレーサーを有する磁性粒子は、マグネットラックを転倒し上澄み液を捨てることで除去されるものである非結合トレーサーを残したまま、チューブの底部へ引きつけられた。このペレット中の放射能は、トラカ-1290 ガンマ カウンター [Tracor 1290 Gamma Counter] (トラカ-アナリティック インコーポレーテッド [Tracor Analytic, Inc.]、エルク グローブビレッジ、イリノイ州)により測定された。

またこの検定法に用いられた試薬は次の通りである。標準は、T<sub>4</sub>をT<sub>4</sub>のないヒト血清に加えることにより調製された。T<sub>4</sub>は、カーター [Carter] の方法〔クリン ケム 24,362 (1978)〕に従い、活性木炭を除去するために濾過を伴なう活性木炭での血清の培養により血清より除去された。トレーサーは、ケンブリッジメディカル ダイアグノスティクス [Cambridge Medical Diagnostics] より購入された<sup>125</sup>I-サイロキシン (#155)であり、ウシ血清アルブミン100μg/ml、サリチル酸塩10μg/mlおよび8-アミノノフタレン-8-スルホン酸50μg/mlを含む0.01M-トリスバッファ [Tris buffer] (2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール) 中へ希釈された。0.1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中における種々の濃度での磁性粒子が、T<sub>4</sub>測定に適した粒子濃度を決定するためRIA

31

中に使用された。チューブ当りの約 $50\mu\text{g}$ の磁気粒子の量がRIAのために選択された。この量は、T<sub>4</sub>の望まれる濃度範囲(0~ $32\mu\text{g/dl}$ )に関して抗体からのトレーサーの良好な置き換えを許容した。

このように最適範囲を測定したこと、上記に述べたRIA法が、T<sub>4</sub>に関する放射標識免疫検定標準曲線を作成するためにはチューブ当り約 $50\mu\text{g}$ の磁性粒子を用いて行なわれた。このRIAにより得られた結果を第3表に示す。

第3表

T <sub>4</sub> に関するRIA標準曲線	
T <sub>4</sub> 濃度	cpm(2つのチューブの平均)
0 μg/dl	36763
2 μg/dl	24880
4 μg/dl	18916
8 μg/dl	13737
16 μg/dl	10159
32 μg/dl	7632
総量	69219

VI-6.

#### テロフィリンに関する磁性粒子 放射標識免疫検定法

ウサギ抗テロフィリン抗体は第VI-4節に述べたものと同様の方法により調製されP-アミノフェニルシラン化粒子に結合された。この抗テロフィリン抗体結合磁性粒子は、以下の態様で放射標識免疫検定法に用いられた。テオフィリン標準(テオフィリンを有しないヒト血清に、テオフィリンを加えることで得られた。)  $20\mu\text{l}, ^{125}\text{I}-\text{テオフィリントレーザー}$  [クリニカルアッセイズ [Clinical Assays] (ケンブリッジ、マサチューセッツ州) 製]  $10\text{ }\mu\text{l}$  および抗体結合磁性粒子が渦動攪拌された。室温での15分間の培養の後に、10分間の磁気分離が行なわれた。標準曲線が作成された。得られたデータを第4表に示す。

第4表

#### テロフィリンに関するRIA標準曲線

テロフィリン濃度	cpm(2つのチューブの平均)
0 μg/dl	35061
2 μg/dl	28217
8 μg/dl	19797
20 μg/dl	13352
60 μg/dl	8148
総量	52461

VI-7.

T<sub>4</sub>放射標識免疫検定法における磁性粒子のFe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>比の変化の影響

第VI-1節の結晶化方法に従い、鉄の一定モル量は維持するがFe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>比を4から0.5の間に変えて、磁性酸化鉄が調製された。これらの粒子はそれぞれ第VI-2節、第VI-4節および第VI-5節に述べられるようにし

32

てシラン化され、抗T<sub>4</sub>抗体と結合されそしてT<sub>4</sub>RIAに用いられた。

Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>比の変化は第5表に示すようにT<sub>4</sub>RIAにおいてこれらの磁性粒子の性能に実質的に影響をもたらさなかった。

第5表

#### Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>比の変えられた磁性粒子を用いてのT<sub>4</sub>RIA標準曲線

T <sub>4</sub> 濃度	cpm(2つのチューブの平均)	
	Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup> =4	Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup> =0.5
0 μg/dl	35633	35642
1 μg/dl	31681	33139
2 μg/dl	30572	30159
4 μg/dl	24702	25543
8 μg/dl	18680	19720
16 μg/dl	12803	11625
32 μg/dl	10012	8005
総量	77866	75636

20 VI-8. カルボン酸末端化磁性粒子のB<sub>1</sub>結合タンパクへの結合

VI-8-1.

#### カルボン酸末端化磁性粒子の調製

超常磁性酸化鉄が第VI-1節に述べた方法によって調製され、そして、アミノフェニルシランの代わりに3-アミノプロビルトリメトキシシランを用いて第VI-2節に述べるようにしてシラン化された。シランのアミノ基は次に、末端化をアミンからカルボン酸に転化するために無水グルタル酸と反応させられた。末端化の転化は次のようにして行なわれた。水中のアミノプロビルシラン粒子の5gが、第VI-1節の洗浄方法を用いて0.1N-NaHCO<sub>3</sub> 0.15Mで4回洗浄された。容積が100mlに調整され、無水グルタル酸2.85gが添加された。粒子は2度洗浄されそして無水グルタル酸での反応がくり返された。タンパクとの反応に用いられるものを調製するため、カルボン酸末端化磁性粒子は水で5回洗浄された。

VI-8-2.

#### B<sub>1</sub>結合タンパクおよびヒト血清アルブミンのカルボン酸末端化磁性粒子へのカルボジイミドカップリング

40 水1ml中のカルボキシ末端化磁性粒子50mgへ、3-(3-ジメチルアミノプロビル)-カルボジイミド4mgが添加された。2分間の振動による混合の後、B<sub>1</sub>結合タンパク〔ドクターアール エッチ アレン〔Dr.R.H.Allen〕(デンバー、コロラド州)より得られた豚の腸の内因性因子(IF)〕0.05mgおよびヒト血清アルブミン〔HS A シグマケミカル コーポレーション〔Sigma Chemical Co.〕, A-8763〕0.75mgが水中の0.30mlへ加えられた。3時間の間pHは、0.1N-HClまたは0.1N-NaOHを添加することによりpH5.6に調整され維持された。粒子は次に、0.5M-MgCl<sub>2</sub>を有するpH8.3の0.1M-ホウ酸塩10ml,

0.1%HSAを有するリン酸緩衝食塩水（PBS）10ml、そして蒸留水10mlで、第VI-1節に述べたような磁気分離法を用いながら洗浄された。粒子はPBSで3度洗浄され、使用までPBS中に保存された。

VI-9.

#### ビタミンB<sub>12</sub>に関する磁性粒子競合検定法

第VI-7節の方法により調製されたIF-およびHSA-結合磁性粒子について、粒子の滴定が、ビタミンB<sub>12</sub>（B<sub>12</sub>）に関する競合結合検定法において必要とされる粒子の量を確かめるために行なわれた。次の検定法態様が用いられた。標準の緩衝液100μlとトレーサーの緩衝液1000μlが12×75mmポリプロピレン製チューブに入れられた。混合物は、ヒト血清試料中の結合タンパクの変性をなすために15分間沸騰した湯浴中へ入れられた。次にリン酸緩衝液中の種々の濃度の磁性粒子100μlが、0～2000ピコグラム／ミリリットル（pg/ml）のB<sub>12</sub>濃度の検定に最適な粒子濃度を決定するために加えられた。室温で1時間の培養の後、結合B<sub>12</sub>と遊離B<sub>12</sub>の磁気分離が第VI-5節で述べた方法およびマグネットチックラックを用いて行なわれた。次に、ベレット中の放射能が、トラカーレーザー1290 ガンマ カウンター〔トラカーナンテック インコーポレーテッド、エルク グローブビレッヂ、イリノイ州〕を用いて測定された。

この検定に用いられた試葉は次の通りである。B<sub>12</sub>標準は、コーニング メディカル アンド サイエンティフィック [Corning Medical and Scientific] (ディビジョン オブ コーニング グラス ワークス [Division of Corning Glass Works])、メドフィールド、マサチューセッツ州より得られた (# 474267)。これらは、PBS中のB<sub>12</sub>をもたないヒト血清アルブミンおよび防腐剤として加えられたアシ化ナトリウムと共に調製される。トレーサーは、コーニングメディカル アンド サイエンティフィック (ディビジョン オブ コーニング グラス ワークス、メドフィールド マサチューセッツ州)より得られた<sup>57</sup>Co-B<sub>12</sub> (放射性コバルトで標識されたビタミンB<sub>12</sub>) (# 474287) であった。トレーサーは0.001%シアノ化カリウムおよびアシ化ナトリウムを含むpH9.2のホウ酸塩緩衝液中にある。磁性粒子は0～2000pg/mlのB<sub>12</sub>濃度を測定するのに必要とされる粒子の量を決定するために種々の濃度でPBS中に希釈された。約50μg/チューブの磁性粒子の量が選択され、そして標準曲線を作成するために上記のB<sub>12</sub>競合結合検定法において使用された。データは第6表に示される。

第6表

#### B<sub>12</sub>競合結合検定法標準曲線

B <sub>12</sub> 濃度	cpm (2つのチューブの平均)
0pg/dl	5523
100pg/dl	5220
250pg/dl	4169
500pg/dl	3295

1000pg/dl	2778
2000pg/dl	1745
総 量	16515
VI-10.	
アミノエチル-3-アミノプロピルシランで被覆された磁性粒子のタンパクへの結合	
VI-10-1.	
N-2-アミノエチル-3アミノプロピルシラン化磁性粒子のタンパクへの結合	
10 第VI-2節のようにして調製されたN-2-アミノエチル-3-アミノプロピルシラン化磁性粒子（粒子がN/Si比2を有するという意味の「二窒素」のため「DIN」と略される。）6/10gが、水中に再懸濁された。粒子は、洗浄と洗浄の間に磁気分離を行なって、水中で1度およびその後pH7.4の0.1M-リン酸緩衝液30mlで2度洗浄された。洗浄粒子の0.1M-リン酸塩15ml中への懸濁の後に、0.1M-リン酸塩で25%グルタルアルデヒド〔G-5882、シグマケミカル コーポレーション、セントルイス、ミズーリー州〕を希釈することで調製されたグルタルアルデヒドの5%溶液15mlが加えられた。グルタルアルデヒド活性化粒子は、次に0.1M-リン酸塩15ml中へ再懸濁された。	
20 トリアイオドチロニン (T <sub>3</sub> ) 抗血清 (1.6ml, T <sub>3</sub> -BSA共役物でウサギを免疫することにより得られた。) が活性化粒子へ加えられ、室温で16～24時間ホイールミキサーで攪拌した。T <sub>3</sub> 抗体結合粒子は0.1M-リン酸塩30mlで1度洗浄され、そして、未反応のアルデヒド基を反応するように0.2M-グリシン溶液15ml中に懸濁された。懸濁液は、25分間振動により混合された。抗体結合粒子は0.1M-リン酸塩30mlおよびエタノール30mlで洗浄され、そして0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBS150mlで2回洗浄された。これは、1%BSAを含むPBS中に再懸濁され、T <sub>3</sub> に関するRIAに使用されるまで4℃で保存された。	
30 VI-10-2.	
N-2-アミノエチル-3-アミノプロピルシラン化磁性粒子の甲状腺刺激ホルモンに対する抗体への結合	
40 第VI-10-1節の結合方法が最小限変更された。DIN粒子20gが、グルタルアルデヒド活性化の前にメタノール1.5lで3度洗浄された。グルタルアルデヒド活性化は、規模を調整して第VI-10-1節に述べられたようにして行なわれた。	
ヒト甲状腺刺激ホルモン (TSH) に対する抗体を含んでいるヤギβ-クロブリン成分は、全ての抗血清よりも幾分多くDIN粒子に結合した。分画は、PBSでの透析を伴なって、40%硫酸アンモニウムを用いてβ-クロブリンを沈澱させることにより行なわれた。約4gのタンパク (20mg/mlで200ml) が結合していた。タンパクの完全な付着は、結合の後の上澄液中に280nmでの光学濃度が不在で	

あることにより確認された。これは、粒子1グラム当り約タンパク20mgの付着を示した。粒子は次に、1M-NaCl 1.5lで2度およびPBSで3度洗浄され、そして50°Cで一晩培養された。次に、粒子はPBS/BSA中で3度以上洗浄され、TSH検定法における使用に関して滴定された。

## VI-11.

## トリアイドチロニンに関する磁性粒子放射標識免疫検定法

T<sub>3</sub> RIAに用いられる粒子の量が次の検定法により決定された。標準は、T<sub>3</sub>を有しないヒト血清にT<sub>3</sub>をT<sub>4</sub>の場合のようにして加えることにより調製された（第7.5節参照）。トレーサーはコーニング メデカル アンド サイエンティフィック【ディビジョン オブ コーニング ワークス、メドフィールド、マサチューセッツ州】より得られた<sup>125</sup>I-T<sub>3</sub>（# 47106）であった。磁性粒子は、必要とされる粒子の量を決定するためにPBS-BSA中へ種々の濃度で希釈された。この検定法態様は次の通りであった。標準50

$\mu$ l、トレーサー100 $\mu$ lおよびDIN磁性粒子800 $\mu$ lが1 $\times$ 25mmポリプロピレン製チューブ中へビペットを用いて入れられた。渦動の後、チューブは室温で2時間培養された。この検定法は磁気分離により終了された。0ng/ml標準を用いて検定法における粒子の量を滴定することによって、30 $\mu$ l/チューブの量が、この検定法態様において最適であると思われた。第7表は、この量の粒子を用いて得られたT<sub>3</sub> RIA標準曲線データを示すものである。

第7表  
T<sub>3</sub>に関するRIA標準曲線

T <sub>3</sub> 濃度	cpm (2つのチューブの平均)
0.0ng/ml	17278
0.25ng/ml	15034
0.50ng/ml	13456
1.00ng/ml	12127
2.00ng/ml	8758
4.00ng/ml	5776
8.00ng/ml	3897
総 量	26946

## VI-12.

## 甲状腺刺激ホルモンに関する磁性粒子放射標識免疫検定法

TSH RIAに用いられる粒子量が以下の検定法により検定された。標準は、正常ヒト血清中のもの【コーニング メデカル アンド サイエンティフィック製# 47186

（メドフィールド、マサチューセッツ州）】であった。トレーサーはPBS中の<sup>125</sup>I-ウサギ抗TSH【コーニング アンド サイエンティフィック製# 474185（メドフィールド、マサチューセッツ州）】であった。磁性粒子は、必要とされる粒子の量を決定するためにPBS-BSA中へ種々の濃度で希釈された。

この検定法態様は次の通りである。標準100 $\mu$ lおよびトレーサー100 $\mu$ lが12 $\times$ 75mmポリプロピレン製チューブ中へビペットにより入れられ、渦動され、そして室温で3時間培養された。磁性粒子（500 $\mu$ l）が加えられ、混合物は渦動されそして室温で1時間培養された。水500 $\mu$ lが加えられ、そして結合トレーザーを非結合トレーザーから分離するために通常の磁気分離が用いられた。TSHの存在において、磁性抗体（ヤギ抗TSH抗体、VI-10-1 参照）TSHとトレーザー<sup>125</sup>I抗体（ウサギ抗TSH抗体）との間でサンドウィッチが形成される。これゆえ、分析物（TSH）の増加する濃度は、結合放射能の量を増加する。第8表は、この手法により得られたTSH RIA標準曲線データを示すものである。

第8表

TSHに関するRIA標準曲線

TSH濃度	cpm
0 $\mu$ IU <sup>r</sup> /ml	1615
1.5 $\mu$ IU <sup>r</sup> /ml	2309
3.0 $\mu$ IU <sup>r</sup> /ml	3014
6.0 $\mu$ IU <sup>r</sup> /ml	4448
15.0 $\mu$ IU <sup>r</sup> /ml	7793
30.0 $\mu$ IU <sup>r</sup> /ml	11063
60.0 $\mu$ IU <sup>r</sup> /ml	15030
総 量	45168

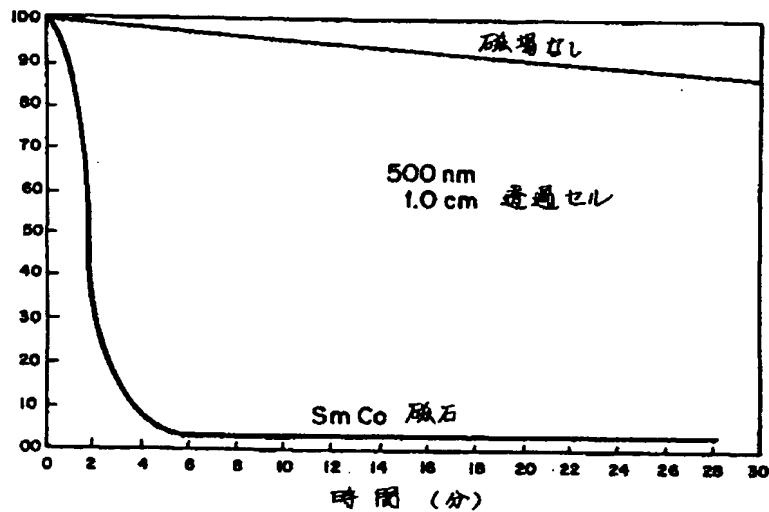
\* $\mu$  IU=マイクロ国際単位

以上述べたように、本発明は、その発明の範囲内において、多くの変更および置換が可能である。なお、述べられた特定の実施態様は、例示のためのみ与えられたものであり、何ら本発明を限定するものではなく、本発明は特許請求の範囲の記載によってのみ限定されるものである。

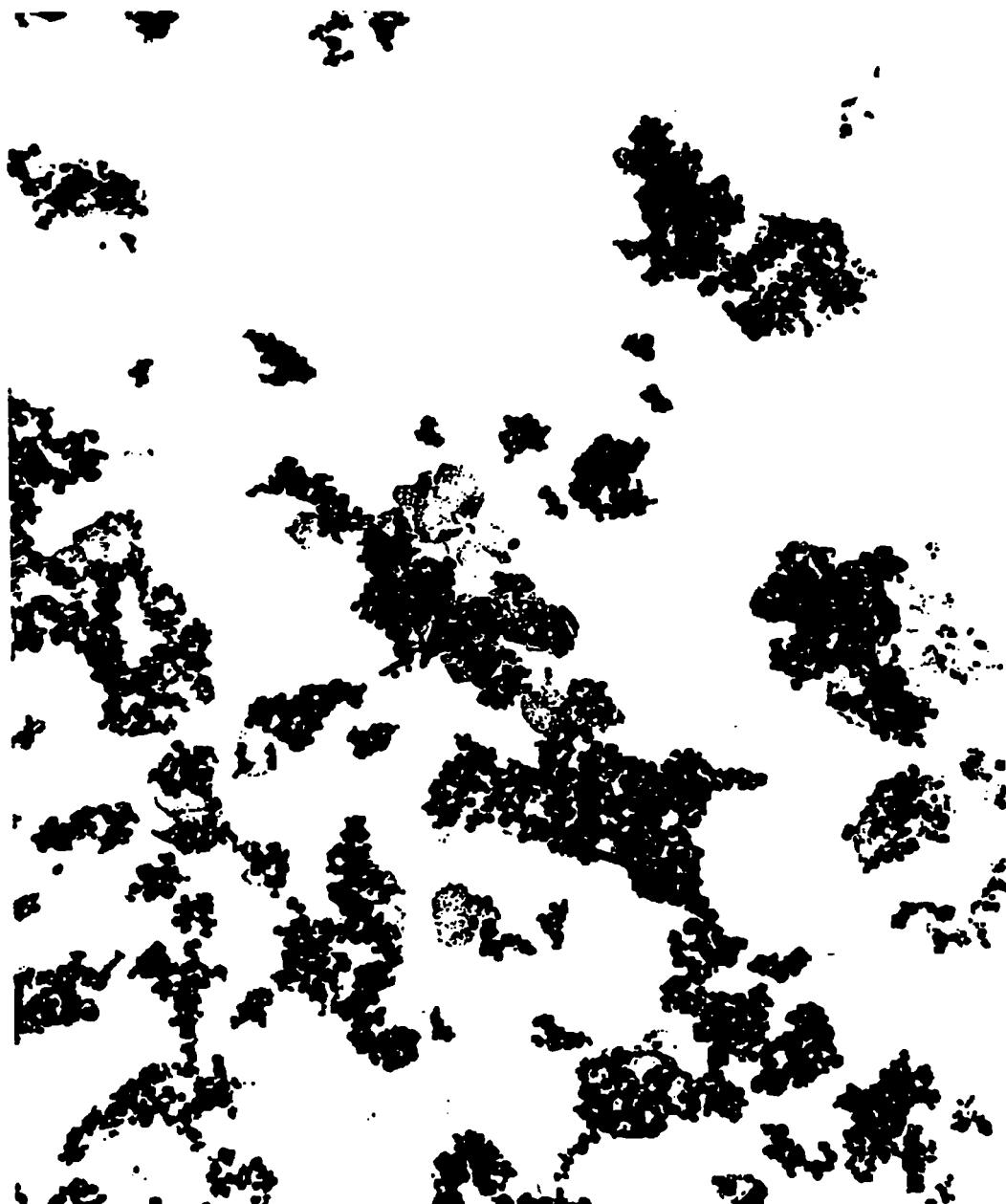
## 【図面の簡単な説明】

第1図は、本発明に用いられる磁性粒子の一実施例に係る磁性粒子懸濁液の濁り度（%濃度）の磁場の存在または不存在における経時的变化を示すグラフであり、また第2図は、3-アミノプロピルトリメトキシシランでシラン化された超常磁性粒子の顕微鏡写真図を示すものである。

【第1図】



【第2図】



---

フロントページの続き

(72)発明者 アーネスト・ピクター・グロマン  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州ブルック  
クリン・コロンビア・ストリート80

(72)発明者 リー・ジョセフソン  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州アーリ  
ントン・マーチン・ストリート11

(21)

特公平7-6986

(72)発明者 ロイ・アーサー・ホワイトヘッド  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州ヒンガ  
ム・メイン・ストリート626

(56)参考文献 特開 昭58-61829 (J P, A)

【公報種別】特許法（平成6年法律第116号による改正前。）第64条の規定による補正

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成9年（1997）11月5日

【公告番号】特公平7-6986

【公告日】平成7年（1995）1月30日

【年通号数】特許公報7-175

【出願番号】特願昭59-95470

【特許番号】2113602

【国際特許分類第6版】

G01N 33/543 521 276-2J

525 C 276-2J

【手続補正書】

1 「特許請求の範囲」の項を「1 a) 生親和性分子が共有結合し得る重合性シラン被膜によりほぼ覆われた超常磁性酸化鉄核を有する生化学用磁気応答粒子であって、該酸化鉄核は2価および3価の酸化鉄結晶群から実質的に成り、光分散により測定される該粒子の平均直径は0.1～1.5μの範囲にあり、窒素ガス吸着により測定される該粒子の表面積は100～150m<sup>2</sup>/gの範囲にあり、また①磁場の存在しない状態において、その水性分散体の50%濁り度減少沈降時間が約1.5時間以上でかつ②水性分散体の容積を入れた容器を容器中の水性分散体の容積よりも小さな容積を有する永久磁石の磁極面と接触させることにより水性分散体にかけられるものである100～1000エルステッドの磁場の存在する状態において、その水性分散体の95%濁り度減少分離時間が約10分以下である水性分散体を形成するように水性媒体中に分散可能である粒子質量を有しており、前記重合性シラン被膜はp-アミノフェニルトリメトキシシラン、n-ドデシルトリエトキシシランおよびn-ヘキシルトリメトキシシランからなる群より選ばれたシラン単量体から形成されたものである磁気応答粒子を用意し、溶液、既知量の標識リゲートおよび溶液中のリゲートに特異性のリガンドが共有結合されている前記磁気応答粒子を、リガンド／

リゲート複合体を形成するために反応させ、

- b) 前記磁気応答粒子を反応溶液から磁気分離し、
- c) 前記磁気応答粒子に結合した標識または溶液中の遊離標識を測定し、そして
- d) c)段階で測定された標識の量を、リゲート濃度を測定するために標準曲線に相関させることからなる溶液中のリゲートの濃度の測定方法。

2 リガンドが抗体である特許請求の範囲第1項に記載の測定方法。

3 抗体が、抗サイロキシン抗体、抗トリアイオドチロニン抗体、抗甲状腺刺激ホルモン抗体、抗甲状腺結合グロブリン抗体、抗サイログロブリン抗体、抗ジゴキシン抗体、抗コルチゾール抗体、抗インスリン抗体、抗テロフィリン抗体、抗ヒタミンB<sub>12</sub>抗体、抗葉酸塩抗体、抗フェリチン抗体、抗ヒト総毛性ゴナドトロピン抗体、抗卵胞刺激ホルモン抗体、抗黄体化ホルモン抗体、抗プロテステロン抗体、抗テストステロン抗体、抗エストリオール抗体、抗エストラジオール抗体、抗プロラクチン抗体、抗ヒト胎盤性ラクトゲン抗体、抗ガストリン抗体および抗ヒト成長ホルモン抗体からなる群から選ばれる抗体である特許請求の範囲第2項に記載の測定方法。」と補正する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**